

EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut



Marian Põldmets

**BIOPREPARAADI BACTOMIX 5 TOIME RISTÕIELISTE
NUUTRITEKITAJA (*PLASMODIOPHORA BRASSICAE*)
ARENGU TAKISTAMISEL**

**THE EFFECT OF THE BIOLOGICAL PRODUCT BACTOMIX 5
ON THE DEVELOPMENT OF CLUBROOT CAUSED BY
*PLASMODIOPHORA BRASSICAE***

Bakalaureusetöö
Aianduse õppekava

Juhendajad: Riinu Kiiker, *MSc*
Kaire Loit, *MSc*
Angela Ploomi, *PhD*

Tartu 2019

Eesti Maaülikool		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014			
Autor: Marian Põldmets		Õppekava: Aiandus	
Pealkiri: Biopreparaadi Bactomix 5 toime ristõieliste nuutritekitaja (<i>Plasmodiophora brassicae</i>) arengu takistamisel			
Lehekülgi: 49	Jooniseid: 6	Tabeleid: -	Lisasid: 3
Osakond / Õppetool: Taimetervise õppetool			
ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: B390 Taimekasvatus, aiandus, taimekaitsevahendid, taimehaigused			
Juhendaja(d): Riinu Kiiker, Kaire Loit, Angela Ploomi			
Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu, 05.06.2019			
<p>Ristõieliste nuutrit põhjustav mullapatogeen <i>Plasmodiophora brassicae</i> on mullas võimeline säilima ligikaudu 20 aastat. Tänapäeval efektiivsed tõrjemeetodid nakkuse kontrollimiseks puuduvad. Alternatiivse tõrjemeetodina on uuritud mullas esinevaid baktereid, mis on <i>in vitro</i> katsetes tõestanud mullapatogeene allasuruvat toimet.</p> <p>Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on teha kindlaks biopreparaadi Bactomix 5 potentsiaal ristõieliste nuutritekitaja (<i>P. brassicae</i>) arengu takistamisel, samuti rakendada ja hinnata kvantitatiivse PCR (qPCR) meetodika sobivust <i>P. brassicae</i> puhkeoste hulga määramiseks mullast. Uurimusest selgus, et mulla töötlemisel kasutatud biopreparaat Bactomix 5 mõju ristõieliste nuutrit põhjustava patogeeni <i>P. brassicae</i> alla surumisel ei ilmnenud ja patogeeni kogus mullas ei vähenenud. Seejuures oli qPCR meetodika sobiv ja usaldusväärne viis <i>P. brassicae</i> püsieoste kvantitatiivsel määramisel mullast. <i>P. brassicae</i> hulga suur varieerumine erinevate pottide muldade seas näitab meetodika täpsustamise vajadust proovide maksimaalse homogeniseerimise näol. Edaspidiseid katseid on soovitatav läbi viia kontrollitud toimeainet sisaldavate bioloogiliste preparaatidega ristõieliste kultuuride piires.</p>			
Märksõnad: Bactomix 5, biotõrje, mullapatogeenid, qPCR, ristõieliste nuuter			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Bachelor's Thesis	
Author: Marian Põldmets		Curriculum: Horticulture	
Title: The effect of the biological product Bactomix 5 on the development of clubroot caused by <i>Plasmodiophora brassicae</i>			
Pages: 49	Figures: 6	Tables: -	Appendixes: 3
Department / Chair: Plant Health Field of research and (CERC S) code: B390 Phytotechny, horticulture, crop protection, phytopathology Supervisors: Riinu Kiiker, Kaire Loit, Angela Ploomi Place and date: June 5, 2019, Tartu			
<p><i>Plasmodiophora brassicae</i> is an economically significant soil borne pathogen causing club root disease in Brassica species resulting in considerable yield losses among crucifer crops. The pathogen is difficult to manage since its resting spores are viable in soil for many years and the cultural practices of the disease are limited. Biological control has proven to be an appropriate alternative in fighting plant pathogens. Some species of bacteria have the ability to suppress diseases, exhibiting activities against plant pathogens.</p> <p>The aim of this study was to analyse the effect of a certain bacterial product Bactomix 5 on the development of clubroot and its potential pathogen suppressive activity and assess the suitability of real-time PCR method for detection and quantification of <i>P. brassicae</i> resting spores in the soil.</p> <p>The results showed no significant effect of Bactomix 5 on the development on <i>P. brassicae</i>. On the other hand, qPCR proved to be rapid and sensitive method for quantifying <i>P. brassicae</i> DNA. For more detailed conclusions, further research based on testing different biocontrol products on <i>P. brassicae</i> is needed. Products containing only one active agent rather than a mixture of multiple substances is advised.</p>			
Keywords: bacterial product, biocontrol, clubroot, soil pathogens, qPCR			

SISUKORD

LÜHENDITE LOETELU	6
SISSEJUHATUS	7
1. BIOLOOGILISTE PREPARAATIDE KASUTAMINE PÕLLUMAJANDUSES	9
1.1. Biopreparaadi olemus	9
1.2. Biopreparaatide kasutamine põllukultuuridel	11
1.3. Mullapatogeenide biotõrjes enim kasutatud bakteriliigid ja nende kirjeldus	13
2. RISTÕIELISTE NUUTER JA SELLE TEKITAJA PLASMODIOPHORA BRASSICAE	17
2.1. Kirjeldus, olemus ja ohtlikkus taimekasvatuse jaoks	17
2.2. Tõrje	21
2.3. Bactomix 5	23
3. MATERJALID JA METOODIKA	24
3.1. Laborikatsed	24
3.2. DNA eraldamine	25
3.3. Muldadest <i>P. brassicae</i> hulga määramine molekulaarselt qPCR metoodikaga	25
4. TULEMUSED	28
5. ARUTELU JA JÄRELDUSED	31
KASUTATUD KIRJANDUS	35
THE EFFECT OF THE BIOLOGICAL PRODUCT BACTOMIX 5 ON THE DEVELOPMENT OF CLUBROOT CAUSED BY PLASMODIOPHORA BRASSICAE	42

LISAD	44
Lisa 1. Bactomix 5 etikett	45
Lisa 2. Pildid katsevariantide P1, P2, P3, P4 taimedest katse lõpus	47
Lisa 3. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta.....	49

LÜHENDITE LOETELU

PGPR – taime kasvu soodustavad risobakterid

qPCR – kvantitatiivne ehk reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon

rRNA – ribosomaalne ribonukleiinhape

SISSEJUHATUS

Ristõieliste nuuter (*Plasmodiaphora brassicae*) on tõsine mullas säiliv haigustekitaja, mis nakatab ristõielisi põllumajanduskultuure ja põhjustab märkimisväärsed saagikadusid üle kogu maailma (Hwang, *et al.* 2012; Dixon, 2009). Patogeeni kahjulikkust iseloomustab tema võime püsida mullas kuni 20 aastat (Wallenhammar, 1996), mistõttu on ristõieliste kasvatamine samal kasvukohal piiratud. Senini on ainsateks ennetavateks abinõudeks haiguse tõrjumisel piisava intervalliga külvikord ja resistentsete sortide kasvatamine, kuid antud meetmed pole osutunud piisavalt efektiivseteks (Ricarova *et al.* 2016).

Potentsiaalsete mullapatogeenide antagonistidena on uuritud mitmeid mullas looduslikult esinevaid mikroorganisme, sh baktereid, mis aktiveerivad mulla bioloogilist mitmekesisust ning soodustavad taimejäänuste lagunemist, kuid eelkõige pidurdavad nende ainevahetusproduktid taimepatogeenide levikut ja arengut mullas (O'Brien 2017). Bioloogilise tõrje seisukohalt on need risosfääris elutsevad risobakterid olulise tähtsusega, kuna on mitmetes *in vitro* katsetes tõestanud võimalikku mullapatogeeni allasuruvat toimet (Song *et al.* 2012; Mazzola, Freilich 2017).

Polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) põhinevad molekulaarsed meetodid võimaldavad kiirelt ja täpselt määrata mullapatogeenide olemasolu (Anders, *et al.* 2016). Võrreldes teiste meetoditega on kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni meetoodika (qPCR) kvantitatiivselt täpsem, tundlikum ja samuti universaalne viis paljude taimepatogeenide kindlaks tegemisel (Mumford *et al.* 2000; Schena *et al.* 2004). Kvantitatiivne patogeeni määramine on taimekasvatases uuenduslik lähenemine, mis võib ristõieliste kasvatamisel ja patogeeni tõrje rakendamisel tulevikus olla oluline lüli. Selle põhjal on Rootsis ja mujal välja töötatud mitmeid analüüsi protokolle *P. brassicae* hulga määramiseks mullast (Rennie, *et al.* 2011; Wallenhammer *et al.* 2012; Almquist 2016), mille abil on võimalik taimekasvatajatele luua konkreetset juhised agrotehniliste võtete täiustamiseks (külvikord, viljavaheldus, tõrje).

Vaatamata turul levivatele biostimulaatoritele ja -preparaatidele, millede tooteinfolehel on lubatud patogeene allasuruvat toimet, ei ole läbi viidud piisavalt katseid, tõestamaks nende tegelikku toimet ja efektiivsust.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on teha kindlaks biopreparaadi Bactomix 5 potentsiaal ristõieliste nuutritekitaja (*Plasmodiophora brassicae*) arengu takistamisel, samuti rakendada ja hinnata kvantitatiivse PCR (qPCR) meetodika sobivust *P. brassicae* puhkeoste hulga määramiseks mullast. Katses testitakse biopreparaadi erinevate dooside mõju, mida hinnatakse mullas patogeeni hulga määramisega spetsiifilise molekulaarse meetodikaga. Töös püstitati hüpotees: Bactomix 5 vähendab ristõieliste nuutri tekitaja (*P. brassicae*) hulka mullas ja nakkust taimes.

Tänuavaldused: töö on valminud EMÜ Arengufondi PM170156PKTK projekti toel. Töö autor tänab oma juhendajaid Riinu Kiikerit, Kaire Loit'i, Angela Ploomit ja Tiiu Annukit Scandagra Eesti AS-st biopreparaadiga varustamise eest.

1. BIOLOOGILISTE PREPARAATIDE KASUTAMINE PÕLLUMAJANDUSES

1.1. Biopreparaadi olemus

Biopreparaat on bioloogilise päritoluga taimekaitsevahend, mida kasutatakse taimede kahjurite ja haiguste tõrjumiseks (Kumar 2012). Taimepatoloogias mõistetakse bioloogilise tõrje all mikrobioloogiliste antagonistide võimet pärssida taimehaiguseid ja kahjureid (Pal, Gardener 2006). Patogeenivastaste biopreparaatide toimeaineteks on konkreetset seene- või bakteriliigi tüved (ing. k. *BCA - biocontrol agents*) (O'Brien 2017). Bioloogilised preparaadid on võrreldes sünteetiliste taimekaitsevahenditega keskkonnasõbralikum ja loodussäästlikum alternatiiv taimekahjustajate kontrollimisel, kuna lagunevad looduses ning sobivad kasutamiseks ka integreeritud taimekaitse rakendamisel (Kumar, 2012). Nende mõju võib avalduda ka nende haiguste puhul, millel senised taimekaitse meetodid pole vilja kandnud (Cook, 1993). Lisaks taimekaitsevahenditena rakendatakse biopreparaate ka saastunud muldade puhastamise otstarbel, rikastades põllumaid oluliste mikroorganismidega (Javaid et al. 2016).

Kvaliteetsed bioagendid on võimelised pärssima patogeeni levikut *in vitro*, kuid suudavad paljuneda ja ellu jääda ka välistingimustes (O'Brien, P. 2017). Biopreparaadi toimeainete efektiivsus ei piirdu vaid kahjustajate elutegevuse pidurdamisega, olulised kasutegurid on veel taime kasvu ja arengu soodustamine, taime vastupanuvõime suurendamine, toksiinide inaktiveerimine ja konkurentsivõime toitaimele. Väidetavalt omavad endofüütsetest bakteritest patogeenivastast toimet bakteriliigid seltsist *Actinomycetes*, *Pseudomonas* ning *Bacillus* perekondade esindajad; seeneliikidest *Trichoderma ssp.* (*Ibid.*)

Bioloogiline patogeenide kontroll toimub läbi mitmete antagonistlike mehhanismide: mikroorganismide omavahelisel kokkupuutel surutakse alla patogeense organismi elutegevust.

Otsene antagonism, näiteks hüperparasitism, seisneb patogeeni või selle diaspooride hävinemisel bioloogilise toimeainega kokkupuutel. Seevastu toimib kaudne antagonism taime kaitsereaktsioonide esile kutsumise näol mittepatoogensete bakterite poolt. (Pal, Gardener 2006).

Teatud juhul toodavad mikroorganismid oma elutegevuse käigus antibiootikume, lüütilisi ensüüme ja vesiniktsüaniidi (HCN), millel on samuti haigusi tekitavate patogeenide levikut pärssiv toime. Mikroorganismide elutegevuse käigus tekkivate metaboliitide teket mõjutab mikroobide poolt toiduks kasutatavate elementide, süsiniku ja lämmastiku, sisaldus ja omavaheline suhe mulla orgaanikas. (Pal, Gardener 2006)

Toitainete sisaldus mullas on mikroorganismide paljunemise ja koloniseerimisvõime seisukohalt esmatähtis. Mulla ja taimejuurte koloniseerimise käigus ammendavad mittepatoogensed mikroobid toitainetevaru mullas, millega takistavad patogeensete mikroorganismide levikut. Spekuleeritakse, et patogeenide ja teiste mikroorganismide omavaheline konkurents toitainetele on samuti haigusi limiteeriv tegur, seda eriti mullas esinevate patogeenide *Fusarium* ja *Pythium* puhul, kes nakatavad seeneniidistiku abil ja on seetõttu konkurentsi suhtes tundlikumad kui teised mikroobid. (*Ibid.*)

Uuritud on ka konkurentsi limiteeritud mikroelementide pärast mullas, nagu näiteks raud, mille sisaldus on sõltuvuses mulla pH-st. Madala raua kontsentratsiooniga mullas eritavad teatud mikroorganismid (nt. *Pseudomonas fluorescens* tüved A1, BK1, TL3B1, B10) rauda siduvaid molekule - siderofoore, mis toimivad bioloogilise tõrjemehhanismi vahendina. (Pal, Gardener 2006; Kloepper 1980). Raua parem omastamine mullast võimaldab kommensiaalsetel mikroorganismidel agressiivsemalt koloniseerida taimejuuri ja tõrjuda kahjulike organisme nakkuskolletest (Pal, Gardener 2006).

Lisaks eelnevale on mikroorganismid läbi biokeemiliste stiimulite võimelised taimedes esile kutsuma patogeenvastaseid kaitsemehhanisme, mis oma olemuselt võivad olla lokaalsed või süsteemsed. Looduslikus keskkonnas reguleerivad patogeenvastaseid mehhanisme ka teised mikroorganismid lisaks patogeenile endale. Reeglina kasutavad bioloogilised toimeained haigusetekitaja supressiooniks mitut mehhanismi korraga. (Pal, Gardener 2006)

Bioloogiliste taimekaitsevahendite tõhusus sõltub eelkõige selle toimeaine(te) püsivusest ja konkureerimisvõimest teiste mullas elutsevate mikroorganismidega, et tagada taimale piisav kaitse. Sobiva toimeainega biopreparaati on võimalik toota vedelikuna ja kasutada mulla töötlemiseks või puhtimisvahendina. (O'Brien 2017)

Bioloogiliste toimeainete kasutamine taimehaiguste tõrjel on õigustatud samm juhul, kui senised traditsioonilised ennetavad agrotehnilised võtted ei anna oodatud tulemusi haiguste allasurumisel või pole majanduslikult jätkusuutlikud (*Ibid.*).

1.2. Biopreparaatide kasutamine põllukultuuridel

Erinevatel taimehaigustel ja neid põhjustavatel patogeenidel väga oluline roll saagi limiteerimisel nii põllumajandus- kui ka aianduskultuuridel. Sünteetiliste pestitsiidide negatiivne mõju keskkonnale on sundinud otsima lahendusi bioloogiliste preparaate näol, mille eeliseks on patogeenispetsiifilisus, seega ei kahjusta nende kasutamine teisi organisme. Ülevaateartiklis tuuakse välja, et bioloogiliste taimekaitsevahendite efektiivsus kahjustajate mahasurumisel on võrreldav keemiliste preparaate kasutamisega põllumajanduses. Viimastel aastatel on arusaam bioloogiliste taimekaitsevahendite mõjust taim tervisele oluliselt paranenud. Geenitehnoloogia on võimaldanud paremini mõista bioloogiliste agentide ja peremeestaimede ning nendega seonduvate mikroorganismide vastastikust toimet. (O'Brien 2017)

Viimase dekaadi jooksul on esinenud arvukalt näiteid biopreparaatide rakendatavuse kohta põllumajanduses (O'Brien, 2017). Mitmed mikroorganismid nagu näiteks *Pseudomonas fluorescens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *Trichoderma virens*, *Burkholderia cepacia*, *Saccharomyces sp.*, *Gliocadium sp.* omavad antagonistlikku mõju seenpatogeenide vastu (Suprpta, 2012). Ühes uurimuses tõrjuti patogeeni *Penicillium digitatum* nakatunud mandariini vilju *B. amyloliquefaciens* sisaldava preparaadiga, millest järeldus, et sünteetilise fungitsiidi Imazalil mõju haiguse allasurumisel oli 98%, kusjuures biopreparaadil toimeainega *Bacillus amyloliquefaciens* oli efektiivsus ligilähedane (78%) (O'Brien, 2017). Leitakse, et fungitsiidide ja biopreparaatide

kooskasutamine võib olla veelgi efektiivsem. Nakayama and Sayama (2013) uurimuses järeldus, et kartuli süvikkärna, mida põhjustab *Spongospora subterranea*, tõrjumisel oli tõhusam fungitsiidi-biopreparaadi segu.

Bioloogiliste taimekaitsevahendite puudusena tuuakse välja nende efektiivsuse varieerumine, mis tuleneb geneetiliselt erinevate peremeestaimede vastuvõtlikkuse erinevusest bioloogilisele toimeainele (O'Brien, 2017). Probleemi ühe lahendusena kasutatakse biopreparaatides erinevate bioloogiliste toimeainete segusid. Näiteks järeldus 2013. aasta uuringust, et kõrvitsaliste tõusmepõletiku tõrje puhul on mõjusam kasutada kolme bakteritüve ühes segus võrreldes ühe bakteritüvega (Kim *et al.* 2008). Arvatakse, et erinevates kliimatilistes tingimustes on vajalik kasutada erinevaid toimeainete segusid (O'Brien, 2017). Mõnel juhul on täheldatud erinevate bioloogiliste toimeainete vahel hoopis antagonistlikku toimet, mistõttu on vajalik nende edaspidine identifitseerimine ja vastastikune katsetamine (*Ibid.*).

Tänapäeval on teada koguni 175 mikrobioloogilist toimeainet, mis on kasutusel biotõrjes patogeenide, umbrohtude, putukate ja nematoodide vastu; nendest enamik toimivad just mullapatogeenidele (Singh, 2012; Vinale *et al.* 2008). Risofäär sisaldab mitmeid olulisi mikroorganisme ning patogeenivastaste omadustega liike kogutakse enamjaolt põllumajanduslikelt maadelt, kus nad koosseksisteerivad teiste kahjurite ja kasulike isenditega (Song *et al.* 2012). Muud rikkalikud allikad on veel hein, põhk ja sõnnik (Beric, *et al.* 2012). Mikroorganismid isoleeritakse puhaskultuuris ja säilitatakse agarsöötmetel (Sahu *et al.* 2014).

Viimasel ajal on potentsiaalsete bioloogiliste toimeainetena mainitud aina uusi mikroorganisme, kuid siiski puudub kindel ülevaade nende mõjust välistingimustes erinevates viljelussüsteemides (Damalas, Koutroubas 2018). Efektiivseimaks *Fusarium sp.* poolt põhjustatava gladiooli hübriidide juuremädaniku tõrjevahendiks peetakse *Trichoderma harzaniumil* põhinevaid preparaate, millega töödeldakse taimede sibulaid (Kirk, Shaefer 2015). Samuti tõestati uurimuses (Dubois, *et al.* 2017) preparaadi Tivano (sisaldab *Lactobacillus casei* tüve LPT-111) supresseerivat mõju maasikataimi kahjustavale bakterile *Xanthomonas fragariae*. Käesoleval ajal on globaalsel turul registreeritud erinevaid seente ja bakterite põhised biopreparaate, nende seas Biocon, Bioguard, Ecofit, F-Stop, Soilguard, Mycostop, Rhizoplus Subilex jne (Junaid *et al.* 2013).

Preparaadi efektiivsus sõltub eeskätt selle mikrobioloogilisest koostisest ja töödeldavast substraadist (Lengai, Muthomi 2018). Enne preparaadi registreerimist ja turustamist viiakse läbi rida kontrolletappe, nii labori- kui ka põllukatsed, mille käigus testitakse preparaadi tõhusust kindlale patogeenile (*Ibid.*). Aktiivsed toimeained tehakse kindlaks õhukese kihi kromatograafia (TLC), vedelikukromatograafia (HPLC) või gaasikromatograafiliste meetodite abil (Hossain *et al.* 2013; Araujo *et al.* 2014). Neile lisatakse stabilisaatoreid, emulgaatoreid ja kandeaineid, et parandada preparaadi säilivust ja töötlemiskindlust, samuti vastupidavust kliimatilistele teguritele nagu kuumus, vesi ja happelised ühendid (Lengai, Muthomi 2018). Biopreparaatide välja töötamisel on osutunud efektiivseks ka rekombinantse DNA meetod, mis võimaldab tõsta toodete efektiivsust (Kumar, Singh 2015).

Avaliku ja erasektori vähese koostöö tõttu on bioloogiliste preparaatide laiaulatuslikum tootmine ja turustamine sünteetiliste pestitsiidide kõrval jäänud tagasihoidlikuks. Täiendavalt on vajalikud edasised uuringud uute koostisosade välja selgitamisel kui ka preparaatide valmistamisel, nende tarnimisel ning integreerimisel tavaviljelussüsteemidesse. Oluline on katsetada biopreparaatide ja nende koostisosade mõju avamaatingimustes erinevates viljelussüsteemides, et hinnata nende potentsiaalset patogeenivastast toimet. Nanotehnoloogial põhinev mikrokapseldamine võib olla tulevikuperspektiiv biopreparaatide efektiivsuse tõstmisel. (Damalas, Koutroubas, 2018)

1.3 Mullapatogeenide biotõrjes enim kasutatud bakteriliigid ja nende kirjeldus

Mullapatogeenide tõrje on keeruline risosfääri dünaamilise ja muutliku keskkonna tõttu, kus haigusetekitajad elutsevad taime juurtel ja muld ise sisaldab arvukalt erinevaid mikroorganismide rühmasid (Handelsmann, Stabb 1996). Viimaste aastakümnete jooksul on uuritud ja kirjeldatud arvukalt erinevaid mikroorganisme potentsiaalsete mullapatogeenide antagonistidena, nende hulgas nii seeni kui ka baktereid (Vanacci, Gullino 2000). Mullapatogeene pärssiv mõju on tingitud spetsiifilisest taime ja patogeeni omavahelisest vastastikusest toimest (*Ibid.*).

Enamik katseid on läbi viidud kontrollitud keskkonnas laboritingimustes: kasvatuskambrites, pottides või katsekasvuhoonetes. Suuremahulised uuringud katsepõldudel ja põllumajandusettevõtetes on andnud vastakaid tulemusi, mis tulenevad keskkonnatingimuste ja peremeestaimede genotüüpide varieeruvusest ja seetõttu on potentsiaalsete toimeainete mõju olnud etteaimamatu ja tulemused ebausaldusväärsed. Senini on mullapatogeenide vastast aktiivsust kirjeldatud vaid *in vitro* tingimustes, *in vivo* tingimustes samalaadset edu pole saavutatud (Mazzola, Freilich 2017). Küsimuse all on mikroorganismide võime risosfääris ellu jääda või seda koloniseerida, samuti ei pruugi põllukatsete ajal mullas väljenduda nende kaitsev toime just antud ajamomendil ja kohas (Exposito *et al.* 2017).

Mikroorganismide patogeenvastased mehhanismid on järgnevad: parasitism, konkurents ruumi, vee ja toitainete eest (nt. raud), antibioos antibiootikumide või muude toksiliste ja lüütiliste ühendite abil, mis pärsvad seenpatogeenide eluvõimet, ning taimedes esile kutsutud vastupanuvõime suurendamine haigustekitajale (Whipps 2001; Pal, Gardener 2016). Bakteriliikidest on biopreparaatides enim esindatud *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Serratia* perekonda kuuluvad liigid (Lengai, Muthomi 2018). USAs turustatavate ligikaudu 90 % mikrobioloogiliste biopreparaatide koostises on entomopatogeenne *Bacillus thuringiensis* ehk Bt (Kumar, Singh 2015).

Bioloogilise tõrje seisukohalt on olulise tähtsusega risosfääris elutsevad taime kasvu soodustavad risobakterid (ing. k *PGPR* - *plant growth promoting rhizobacteria*), kes aitavad lahustada fosfaate, toodavad siderofoore ja fütohormoone, seovad õhulämmastikku, toetavad sümbioosseid suhteid mullas, on seente elutegevust pärssiva toimega jne (Bhattacharyya, Jha 2012). Risobakterid on grupp mullas elutsevaid baktereid, kel on võime koloniseerida taime juuri, soodustada taime kasvu ja seeläbi takistada haigustekitajate levikut. PGPR jaguneb kahte alagruppi vastavalt sellele, kas nad tegutsevad juurerakkudes või mitte: rakuvälised bakterid ehk. ePGPR ja rakusisesed endofüütsed bakterid ehk. iPGPR (Martinez-Viveros *et al.* 2010). ePGPR hulka kuuluvad paljude seas *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* perekonnad (Gray, Smith 2005). iPGPR esindajatest on märkimisväärsed *Rhizobiaceae* sugukonda kuuluvad *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* and *Rhizobium sp.*, kes moodustavad kultuurtaimede juurtel mügarikke (Wang, Martinez-Romero 2000) mõjutades

taime kasvu kas otseselt (lämmastiku sidumine, toitainete lahustamine, kasvuhormoonide tootmine) või kaudselt (mükoriisaseente elutegevuse soodustamine, fütotoksiliste ainete või patogeenide elutegevuse taksitamine) (Bhattacharyya, Jha 2012; Bashan, de-Bashan 2010). Mitmed PGPR bakterid on osutunud edukaks antraknoosi (*Colletotrichum lagenarium*), bakteriaalset närbumistõve (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) ja bakterpõletikku (*Erwinia tracheiphila*) põhjustavate patogeenide kontrollimisel (Pal, Gardener 2006).

Bacillus sp. liigid on mullas või risosfääris (sh. taime seemet ja juuri ümbritsevas mullas) elutsevad endofüütsed või epifüütsed bakterid, mis paljunevad puhaskultuuris kiiresti ja moodustavad vastupidavaid eoseid (Beric *et al.* 2011). Seetõttu on keemiliste taimekaitsevahenditele kõrvale ilmunud *Bacillus* sp. tüvedest või nende ainevahetusproduktidest valmistatud erinevaid antimikroobse toimega preparaate (Fravel 2005). *B. subtilis* isolaatide sobivus enamike mullapatogeenide bioloogilise tõrjevahendina on avaldunud eelkõige mükoparasitismis, rakuseinu lagundavate ensüümide ja seentevastaste toksiliste metaboliitide produktsioonis (Alamri *et al.* 2012). 2012. aasta uurimus näitab erinevate *Bacillus* tüvede pärssivat toimet viiele fütopatogeensele bakterile, millest riisi patogeen *X. oryzae* pv. *oryzae* osutus kõige tundlikumaks (Beric *et al.* 2012). *Bacillus* sp. isolaatide antimikroobiline toime võib olla seotud nende poolt sünteesitavate lipopeptiididega (*Ibid.*). On ka leitud, et *B. subtilis* tüvi HZ-72 pärsib lina tõusmepõletikku põhjustava mullapatogeeni *Rhizoctonia solani* ja veel kuue erineva seenpatogeeni elutegevust *in vitro* ja kasvuhoonekatsetes (Tan *et al.* 2018). Veel mitmed *Bacillus* sp. liigid, sh *B. amyloliquefaciens*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* and *B. sphaericus* (Ryu *et al.* 2004) on kaitseensüümide aktiveerimise teel esile kutsunud resistentsust mitmetel peremeesorganismidel, nagu näiteks tomatil, paprikal, suhkrupeedil, arbuusil, melonil, kurgil ja tubakal (Bhattacharyya, Jha 2012; Bharathi 2004).

Pseudomonas spp. on aeroobsed gram-negatiivsed põllumaadel levinud risobakterid (Weller 2007). Nende olulisus seisneb eelkõige paljunemis- ja koloniseerimisvõimes nii mullas kui taimejuurtel, samuti paljunevad nad kiiresti katseklaasis olles sobilikud masstootmiseks (*Ibid.*). Lisaks toodavad bakterid bioaktiivseid ainevahetusprodukte (antibiootikumid, siderosporid, lenduvad ühendid), konkureerivad teiste mikroorganismidega ja adapteeruvad muutuvate keskkonnatingimustega (*Ibid.*). Pseudomonaadide poolt toodetav antibiootikum DAPG (ing k.

2,4-diacetylphloroglucinol) võib esile kutsuda taimes kaitses mehhanisme (Iavicoli *et al.* 2013). Erinevalt *Bacillus* sp. liikidest, ei ole *Pseudomonas* sp. võimelised tootma püsieoseid, mistõttu on neist preparaatide tootmine raskendatud (*Ibid.*). *In vitro* tingimustes on välja selgitatud, et *P. fluorescens* tüvi B103 pärssib erinevate mullapatogeenide (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*) paljunemist (Abou-Aly 2015). Näiteks madala raua sisalduse korral mullas toodab *P. fluorescens* rohakat fluorestseeruvat pigmenti nimega fluorestseiin, millest tuleneb ka bakteri nimi (Ganeshan, Kumar 2005).

2. RISTÕIELISTE NUUTER JA SELLE TEKITAJA PLASMODIOPHORA BRASSICAE

2.1. Kirjeldus, olemus ja ohtlikkus taimekasvatuse jaoks

Plasmodiophora brassicae Woronin on obligatoorne mullapatogeen, mis kuulub protistide supergruppi Rhizaria, Phytomyxea klassi (Hwang *et al.* 2012) ja Plasmodiophorales seltsi (Horst, 2013). Varasemalt on neid peetud limasseenteks ehk limakuteks (*Ibid.*).

Ristõieliste nuuter ehk kapsanuuter (ing. k *clubroot, finger-and-toe-disease*) on majandusliku tähtsusega taimehaigus, mis on levinud rohkem kui 60 erinevas riigis ja esineb eelkõige piirkondades, kus on pikaajaliselt kasvatatud ristõielisi taimi või on ristõieliste külvikord olnud liiga lühike (Hwang *et al.* 2012, Volker 2013). Globaalselt esineb saagikadusid 10-15 % ulatuses (Dixon 2009). Kapsanuuter võib nakatada kõiki ristõieliste sugukonda kuuluvaid looduslike või kultuurtaimede liike (kokku 3700) (Dixon 2009b), nende hulgas rapsi, kaalikat, naerist, sinepit, põldtutra, õlirõigast; kapsaliikidest nakatuvad valge peakapsas, söödakapsas, lehtkapsas, nuikapsas, rooskapsas, pekingi kapsas, hiina kapsas ja lillkapsas, kuid sordid võivad olla haigusele erineva vastuvõtlikkusega (Horst 2013; Volker 2013). Peremeestaimede hulka kuuluvad veel iberis, kress, kuukress, harilik öölill ja levkoi (Horst 2013), umbrohtudest põld-litterhein, põldsinep, põldrõigas ja hiirehernes (Volker 2013). Patogeenil esineb palju füsioloogilisi rasse ja patotüüpe, mis erinevaid taimeliike ja sorte nakatavad (Volker 2013).

Näiteks rapsi puhul on haiguse esinemise tõenäosus suurem liigniiskel happelisel mullal, mis on halvasti õhustatud (Volker 2013). Samuti on nakkusele vastuvõtlikumad noored seemikud võrreldes 10-25 päeva vanuste taimedega (Ricarova *et al.* 2013). Nakatumist soodustavad kõrge õhutemperatuur ja niiskus (Gossen *et al.* 2012), mis aitavad kaasa püsieoste idanemisele ja zoosporide elujõulisusele (Webster 1986). Nakatunud põldudel idanevad püsieosed vaid sobiva peremeestaim olemasolul, mille toodetud juureeritised stimuleerivad püsieoste

idanemist (Zamani-Noor, Bodemann 2018). Teisalt väidetakse, et püsieoste idanemine võib toimuda ka ilma peremeestaimedeta (Friberg *et al.* 2013). Eoste idanemist võivad stimuleerida erinevad mullaorganismid, sh *Bacillus* spp. ja *Pseudomonas* spp (Einhorn *et al.* 1991). Nakkuse levikut mõjutab ka erinevate elementide - kaltsiumi, boori, lämmastiku - sisaldus mullas (Ricarova *et al.* 2013). Kõrgem kaltsiumiioonide sisaldus 6.2 - 7.2 mullahappesuse juures vähendab juurekarvade infektsiooni ja plasmoodiumide küpsusastet (Dixon 2009b). Ent boori madala sisalduse korral mullas ei suuda kaltsiumioonid nakatumist kontrollida (Ricarova, *et al.* 2016). Samuti võib lämmastiku kõrgem sisaldus mullas pärssida kapsanuutri sümptomite levikut (Webster 1986). Erinevad biootilised ja abiootilised tegurid mullas mängivad rolli patogeeni elutegevuse piiramisel (Dixon 2009b).

Haiguse esimesed sümptomid lööbivad noortel taimedel, mis jäävad väikeseks ja kiduraks, misjuures vanemad lehed kolletuvad või muutuvad punakaks. Närbumisilminguid võib märgata kuiva ja sooja ilmaga ning üldjuhul esineb haigus põldudel kolletena. Taimede juurtele tekivad ebakorrapärase kujuga punakaspruunid paksendid, mis on seest valged ja kõvad. Hiljem nakatunud juurekude kasvab mügarlikuks pahaks, mis kasvu lõppedes hakkab mädanema (joonis 1). Sarnase kahjustuspildiga võib olla ka juure-peitkärsaka tekitatud pahk. (Volker 2013)

Juurtel moodustunud paksendid takistavad taimedel toitainete omastamist ja vee transporti (Dixon 2006). Haigus kulmineerub taimede hukuga ning mulla nakatumisega patogeeni puhkeostega, mistõttu ei ole ristõielisi võimalik samal kohal kasvatada mitu aastat (Horst 2013, Volker 2013).

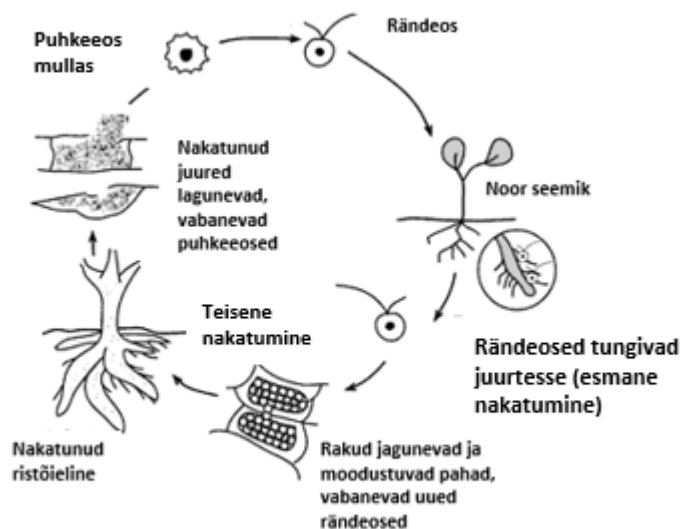


Joonis 1. Lähivaade nuikapsa juurel moodustunud pahast (Plant Parasites of Europe 2019).

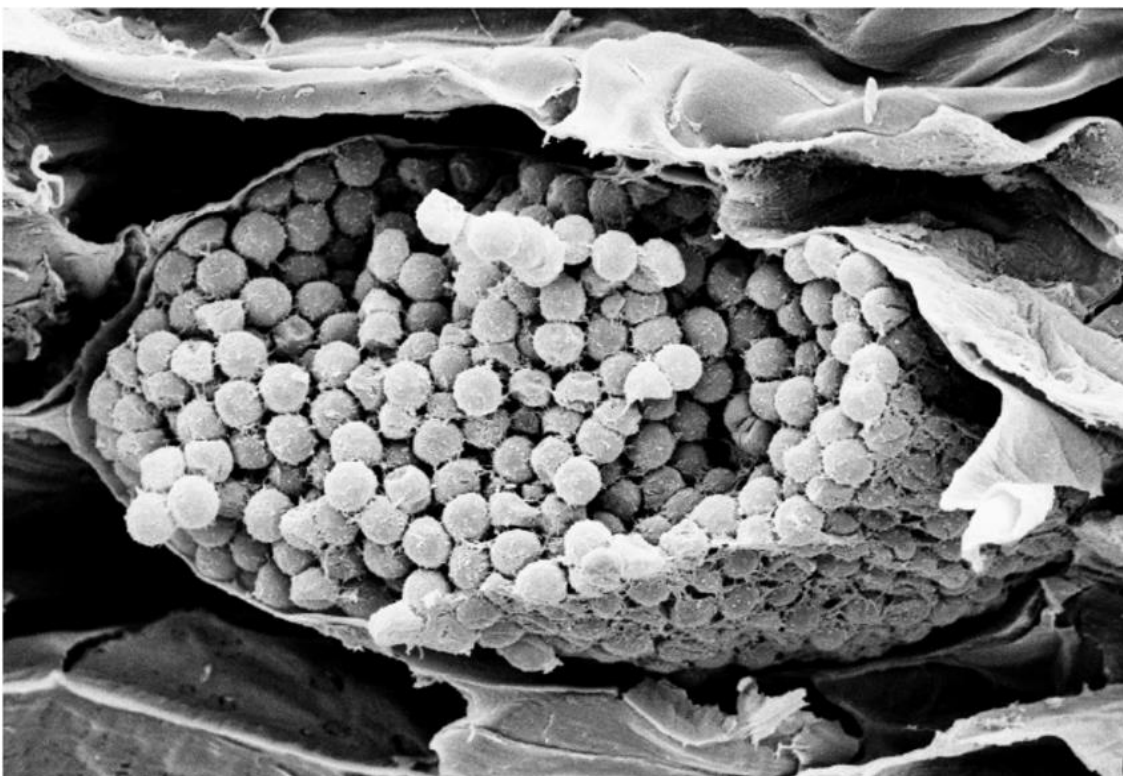
P. brassicae elutsükkel jaguneb kolme faasi: primaarne ja sekundaarne nakkuse faas ning püsieoste säilimine mullas (Ayers 1944; Ingram, Tommerup 1972) (joonis 2). Juurepahkade lagunemisel satuvad mulda püsi- ehk puhkeeosed (joonis 3), mis võivad mullas vastu pidada ilma peremeestaimedeta rohkem kui 15 aastat (Horst 2013; Wallenhammar 1996). Kevadel, soodsate ilmastikutingimuste korral, idanevad puhkeeosed viburitega zoosporideks, mis nakatavad taimejuuri (Horst 2013, Volker 2013). Idanemist soodustavad mitmed faktorid: kõrge mullaniiskus ja temperatuur 20-25 °C, mullastiku happelisus ja lubjavaegus (Volker 2013). On leitud, et *P. brassicae* sümptomid vähenevad märgatavalt temperatuuril alla 17 °C ja ägenevad temperatuuril 24-26 °C (Gossen *et al.* 2012). Nakkus lööbib tugevamalt soojade ja niiskete ilmade korral ning seetõttu nakkuse tugevus varieerub erinevatel aastatel ja on otseses sõltuvuses ilmastikust (Ricarova *et al.* 2016).

Zoosporid ehk rändeosad liiguvad mullaveega taimede juurteni, seejärel tungivad need juurekarva rakku ja moodustavad plasmoodiumi ehk hulktuumse rakukeha (Ricarova *et al.* 2016). Plasmoodium kasvab ja jaguneb kuni kambiumirakkudeni, misjärel levib mööda juurt, tekitades paksendeid (Horst 2013). Hulktuumsetest plasmoodiutest arenevad rändeoslad ehk

zoosporangiumid, kus omakorda arenevad uued zoosporid (*Ibid.*). Juure kõdunemisel satuvad miljonid puhkeosad taas mulda, levides seejuures äravooluvee, jalanõude, põllumasinade ja loomsete väljaheidete ja taimejäätmatega edasi (*Ibid.*). Eosed ei levi edasi seemnetega (*Ibid.*).



Joonis 2. *Plasmodiophora brassicae* elutsükkel (modifitseeritud Ricarova *et al.* 2016 järgi).



Joonis 3. SEM-pilt *Plasmodiophora brassicae* puhkeestest *Brassica rapa*. var *pekinensis* nakatunud juurtel (Friberg 2005).

2.2. Tõrje

Kapsanuutri ennetamisel on olulisim külvikorra rakendamine, mille puhul kasvatatakse ristõielisi taimi samal kohal alles 5 aasta möödumisel (Wallenhammer 1999), lisaks mulla lupjamine vähemalt 6 nädalat enne taimede kohale istutamist, et tagada aluselisem mulla pH (Horst, 2013). Teisalt väidetakse, et ka need agrotehnilised võtted ei ole haiguse kontrollimisel piisavalt efektiivsed, sest patogeen on otseselt seotud mullaga, kus püsieosed on eluvõimelised pikki aastaid (Donald, Porter 2009; Hwang *et al.* 2011). Kui ristõieliste köögiviljade puhul rakendatakse mulla lupjarmist pH tõstmiseks ja töödeldakse taimi fungitsiididega tilkkastmissüsteemi abil (Donald, Porter 2009), siis suurte pindadel kasvavate põllukultuuride puhul nagu raps, ei ole need abinõud tasuvad ega praktilised (Peng *et al.* 2014).

Praegusel ajal ei ole ristõieliste nuutri tõrjumiseks kasutusel ühtki efektiivset laiaulatuslikku sünteetilist taimekaitsevahendit (CABI 2019). Haiguse keemiline tõrje on suurtel aladel raskendatud ja kohati võimatu (Ricarova *et al.* 2016). Poolas läbi viidud uurimuses järeldus on fungitsiid Altima 500 EC ositis nuutri tõrjel efektiivseks fungitsiidiks, bioloogilistest fungitsiididest vähendasid nakkuse ulatust juurtel EM-1 ja Biochikol 020 PC (Kurowski *et al.* 2009). Fungitsiidid Terraclor ja Ranman on osutunud efektiivseks vaid madala patogeeni sisalduse korral mullas (Peng, *et al.* 2014). Sünteetiliste preparaatide kahjuks osutub ka patogeeni võimaliku tolerantsuse tekkimine ja kaudsed mõjud keskkonnale (Compant *et al.* 2005).

Üks alternatiiv keemiliste taimekaitsevahendite kasutamisele on mulla steriliseerimine auruga, mille korral töödeldakse mulda kõrgete temperatuuridega, surmates patogeeneid proteiinide koagulatsiooni ja ensüümide deaktiveerimise teel. Sellegipoolest võivad kuumtöötlemisel olla negatiivsed tagajärjed teistele mullaorganismidele, mistõttu on antud abinõu küsitava väärtusega. (Gao, Xu 2014)

Teine potentsiaalne meetod kapsanuutri tõrjeks väljendub taime kasvu ja tervist edendavate mullabakterite näol. Kontrollitud tingimustes võib kapsanuutri levikut pärssida bakter *Bacillus subtilis* (Lahlali *et al.* 2013) ja nakkuse raskusastet vähendada seen *Gliocladium catenulatum* (Peng *et al.* 2011). Mulla kuumtöötlemine ja erinevate mullaorganismide segu - *Bacillus megaterium*, *Clostridium tyrobutyricum* ja *Saccharomyces cerevisiae* - võib olla efektiivne kapsanuutri tõrjemeele hiina kapsa näitel (Gao, Xu 2014; He *et al.* 2019). Biopreparaadite Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) ja Prestop efektiivsus väljendub antibioosi soodustamises ja immuunreaktsiooni stimuleerimises taimedes (Peng *et al.* 2014). Preparaatide efektiivsus varieerub vahemikus 85-100%, kuid ainult madala nakkuse korral mullas (*Ibid.*). Eestis on Põllumajandusameti taimekaitsevahendite registri andmetel lubatud ristõielistel köögiviljakultuuridel *P. brassicae* tõrjeks kasutada biofungitsiidi Prestop, mille toimeaine on *Gliocladium catenulatum* tüvi J1446 (PMA 2019).

Ennetavate tõrjemeetmetena soovitatakse hilisemat külvi, resistentsete sortide kasvatamist, lupjamist ja viljavaheldust. Olulised abinõud on veel masinate ja tööriistade puhastamine ja desinfitseerimine, kuna põllutööriistad võivad kanda edasi nakatunud mullaosakesi (Ricarova *et al.* 2016). Resistentsete sortide kasutamine on samuti oluline uute ohtlike *P. brassicae*

patotüüpide leviku takistamiseks (*Ibid.*). Resistentsus väljendub eelkõige patogeeni arengu pärssimisel taimes, mitte infektsiooni vältimises. Toimub esmane ja teisene nakatumine, kuid tekkinud plasmoodiumid ei arene välja ja puhkeoseid ei moodustu (Hwang *et al.* 2011b; Deora *et al.* 2013).

P. brassicae populatsiooni levikut põllul mõjutavad ka ristõielised umbrohud ja isekülvanud taimed, mis on peale põhikultuuri koristamist hakanud tahtmatult seemnetega levima. Seetõttu on koristamisjärgne umbrohutõrje ja mullaharimine vajalik meede patogeeni elutsükli katkestamiseks. (Zamani-Noor *et al.* 2018)

2.3. Bactomix 5

Vastavalt tootjapoolsele informatsioonile on Bactomix 5 taimede lagunemist soodustav bioloogiline preparaat, milles sisalduvad mikroorganismid (*Bacillus subtilis* V-845 D ja V-843 D, *Pseudomonas aurantiaca*, *Brevibacillus sp.*, *Bacillus megaterium*) lagundavad taimede jäänuseid, tekkivad antibiootilised ained pidurdavad patogeensete mikroorganismide arenemist, vabastades taimedele vajalikke toiteaineid (LISA 1). Bakterid aitavad fikseerida bioloogilist lämmastiku ja suurendada taimedele omastatava fosfori kogust mullas, millega kiirendab preparaat seemnete idanemist, taimede kasvu, suurendab nende saagikust. Kasuturnormina soovitatakse 1 ha kohta valmistada lahus, kus 0,7-1 l Bactomix 5 on segatuna 100-200 l veega või ühele hektarile külvatavad seemned puhtida 0,5 l biopreparaadiga, lahustatuna 1-5 l vees. Väidetavalt on bakterite kontsentratsioon preparaadis vähemalt 6×10^9 kolooniat moodustavat ühikut milliliitri kohta (Scandagra 2019).

3. MATERJALID JA METOODIKA

3.1. Laborikatsed

Töös analüüsiti *P. brassicae* puhkeostega nakatunud mulda, mis koguti 23.10.2017 Rõhu katsejaama mahekatselappidelt (58°21'58.4"N 26°39'55.1"E). Mullaproovid säilitati 4 °C juures. Potikatsed viidi läbi vahemikus 19.03.2018–25.05.2018 kuue erineva variandiga kuues korduses. Kokku oli 2 L katsepotte 36, kuhu külvati kaks paksoi (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) seemet, millest hiljem kasvama jäeti üks taim. Potikatsede variandid olid järgmised:

- 1) KS (kontrollsteriilne) neg. kontroll - autoklaavitud (121 °C 20 minutit) muld;
- 2) K pos. kontroll - töötlemata muld;
- 3) P1 Bactomix töötlus 1x tootjapoolse soovitatud* doosiga 1. päeval;
- 4) P2 Bactomix töötlus 1x topelt** doosiga 1. päeval;
- 5) P3 Bactomix töötlus 2x norm doosiga 1. ja 20. päeval;
- 6) P4 Bactomix töötlus 2x topelt doosiga 1. ja 20. päeval.

* Tootjapoolne soovitatud doos: 1 ml Bactomix5 + 100 ml destilleeritud vett

** 2x tootjapoolne soovitatud doos: 2 ml Bactomix5 + 100 ml destilleeritud vett

Kasvutingimused kontrollitud kasvukambris olid järgmised:

- 1) suhteline õhuniiskus 70% idanemise ajal;
- 2) suhteline õhuniiskus 60% taimekasvu ajal;
- 3) öösel 8 h pimedust, õhutemperatuur 15°C;
- 4) päeval 16 h valgust, õhutemperatuur 22°C.

Katsepotte ei kastetud iga päev, kuna õhuniiskus oli piisavalt kõrge. Katse lõpus mullad ja taimed kuivatati ja säilitati toatemperatuuril minigrip kottides.

3.2. DNA eraldamine

Igast läbi murendatud mullakotist võeti kaks 0,2 g proovi steriilsetesse 2 ml mikrotsentrifuugituubidesse ja üks proov 50 ml tsentrifuugitopsi. 2 ml tuubidesse lisati 3 metallkuulikest ja raputati läbi Rosche MM400 raputis. DNA eraldamiseks kasutati Power Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.) komplekti. Iga eraldatud proovi DNA kontsentratsioon määrati NanoDrop 2000 spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific Inc.). DNA säilitati -20 °C juures.

3.3. Muldadest *P. brassicae* hulga määramine molekulaarselt qPCR meetoodikaga

Rakusisese parasiidina ei ole *P. brassicae*'d võimalik kasvatada kunstsöötmel, mis omakorda teeb patogeeni määramise keeruliseks (Hwang *et al.* 2012). Usaldusväärseteks molekulaarseteks meetoditeks on patogeeni spetsiifiliste praimeritega teostatud polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) tehnikad, mis võimaldavad amplifitseerida ehk kordistada teatud lõike *P. brassicae* genoomist ja määrata patogeeni olemasolu erinevatest proovidest (Hwang *et al.* 2012). qPCR ehk kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon võimaldab määrata ka patogeeni kogust vastavas proovis (Hwang, *et al.* 2012). qPCR meetodi töö põhineb fluorestseeruvate signaalide kindlaks määramises patogeeni DNA amplifikatsiooni ajal (Ricarova *et al.* 2016).

qPCR reaktsiooni läbi viimiseks valmistati spetsiaalne segu, lõppmahuga 20 µl, kuhu lisati steriilne destilleeritud vesi, 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne) ühekordse lõppkontsentratsiooniga, *P. brassicae* 18S rRNA geeni spetsiifilised praimerid TC1F (5'-GTGGTCGAACCTTCATTAAATTTGGGCTCTT-3') ja RTPbR1a (5'-TCAGCACCGTTTCCGGCTGCTAAGGC-3') (Cao *et al.* 2014) lõppkontsentratsiooniga 0,3

mM ja proovi DNAd 1 µl (kontsentratsiooniga umbes 10 ng/µl). Iga proovi analüüsiti kolmes korduses. Antud töös kasutati geenikoopiate arvu määramiseks uuritavates proovides qPCR-i standardkõvera meetodit, mis teostati Rotor-Gene Q (Qiagen) masinaga. Amplifitseeritav DNA tuvastatakse reaktsiooni jooksul fluorestsentssignaalide abil, mille tõus on proportsionaalne amplifitseeritava DNA hulga. DNA-d tuvastatakse ja kvantifitseeritakse reaajas ehk qPCR tööseeria jooksul, mis koosneb 40 tsüklist, mis omakorda jagunevad kolme etappi: denaturatsioon, praimerite seondumine ja DNA süntees. Esmalt toimub eeltöötlus 2 minuti jooksul UDG ensüümiga 50 °C juures. Järgneb 12 minutiline denaturatsioon 95 °C juures, mil kaheaahelaline DNA sulatatakse üheaahelaliseks. Seejärel korraldatakse kolme etappi 40 tsükli jooksul: denaturatsioon (95 °C, 15 s), praimerite seondumine (60 °C, 30 s) ja DNA süntees (72 °C, 30 s). Iga tsükli lõpus mõõdetakse patogeeni DNA koopiate arv.

Töös kasutati *P. brassicae* genoomset DNA-d standardlahjenduste valmistamiseks. Steriilses destilleeritud vees valmistati *P. brassicae* standardlahus 1×10^6 geenikoopiat/µl, millest tehti standardkõvera jaoks vajalik kümnekordsete lahjenduste rida (1×10^6 kuni 1×10^2 geenikoopiat/µl). Arvutati geenikoopiate arv DNA lahuses (Valem 1).

$$N = \frac{c}{m} Na \text{ (Valem 1)}$$

kus:

N – geenikoopiate arv (geenikoopiat/l)

c – DNA kontsentratsioon (ng/l)

m – geenifragmendi mass Daltonites (Da), (1 bp = 660 Da)

Na – Avogadro arv ($Na = 6,022 \times 10^{23}$)

Proovide individuaalse amplifikatsiooni efektiivsuse hindamiseks kasutati programmi LinRegPCR versiooni 2013.0 (Ruijter *et al.* 2009), millega viidi läbi võõrväärtuste eemaldamine (outlier detection) – arvutati välja iga proovi amplifikatsiooni efektiivsused ning eemaldati proovid, mille efektiivsuse kõrvalekalle keskmisest oli äärmuslik, $|Z| > 1,96$ (Valem 2) (Bar *et al.* 2003).

$$Z = \frac{x_{eff} - \mu_{eff}}{\sigma_{eff}} \text{ (Valem 2), kus:}$$

X_{eff} – proovi individuaalne amplifikatsiooni efektiivsus

μ_{eff} – kõikide proovide keskmine amplifikatsiooni efektiivsus

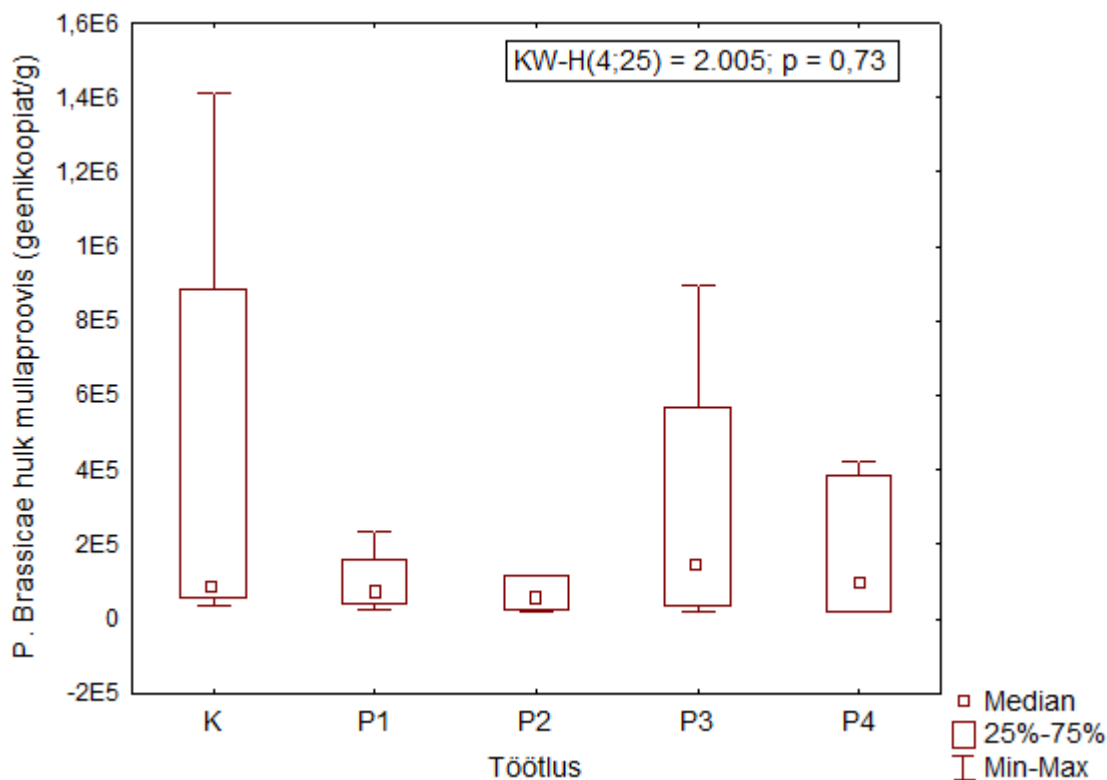
σ_{eff} – kõikide proovide amplifikatsiooni efektiivsuste standardhälve

Iga proovi korduste põhjal arvutati proovi keskmine amplifikatsiooni efektiivsus. Ideaalsetes tingimustes kahekordistub DNA kogus iga qPCR-i amplifikatsioonitsükliga (efektiivsus on 2). LinRegPCR analüüsi järgi jäid uurimisproovide *P. brassicae* 18S rRNA geeni keskmised amplifikatsiooniefektiivsused vahemikku 1,826-1,975. Uuritud patogeeni 18S rRNA geeni koopiarvud määrati pärast kvaliteedikontrolli, võrreldes proovide amplifikatsiooni tulemusi standardkõveratega. Kõikide uuritud proovide geeni koopiarvud väljendati 1 g algse proovi kohta.

Andmeanalüüsid qPCR tulemustele tehti STATISTICA 64 programmiga, kus kasutati mitteparameetrilist Kruskal-Wallis mitmest võrdlust (multiple comparison) üksteisest sõltumatute gruppide vahel.

4. TULEMUSED

Käesoleva katse käigus võrreldi nuutri nakkusega mulla Bactomix 5 erinevaid töötlusteid töötlemata mullaga. Analüüsitud viie katsevariandi (K, P1, P2, P3, P4) tulemused on koondatud joonisele 4, millelt võib näha, et katse töötlusted statistiliselt oluliselt ei erinenud. Sellest järeldeb, et katsetatud biopreparaadi puhul tootjapoolne soovitatud doos ega suurendatud doos ei vähenda antud tingimustes *Plasmodiophora brassicae* hulka mullas.



Joonis 4. *P. brassicae* hulk (geenikoopiat/g) erineva töötlustega pottides katse lõpus.

Kontrollsteriilses (KS) katsevariandis autoklaavitud mullas *P. brassicae* nakkust ei esinenud. Sama variandi taimed olid katse lõpus visuaalsel hinnangul teistega võrreldes paremas

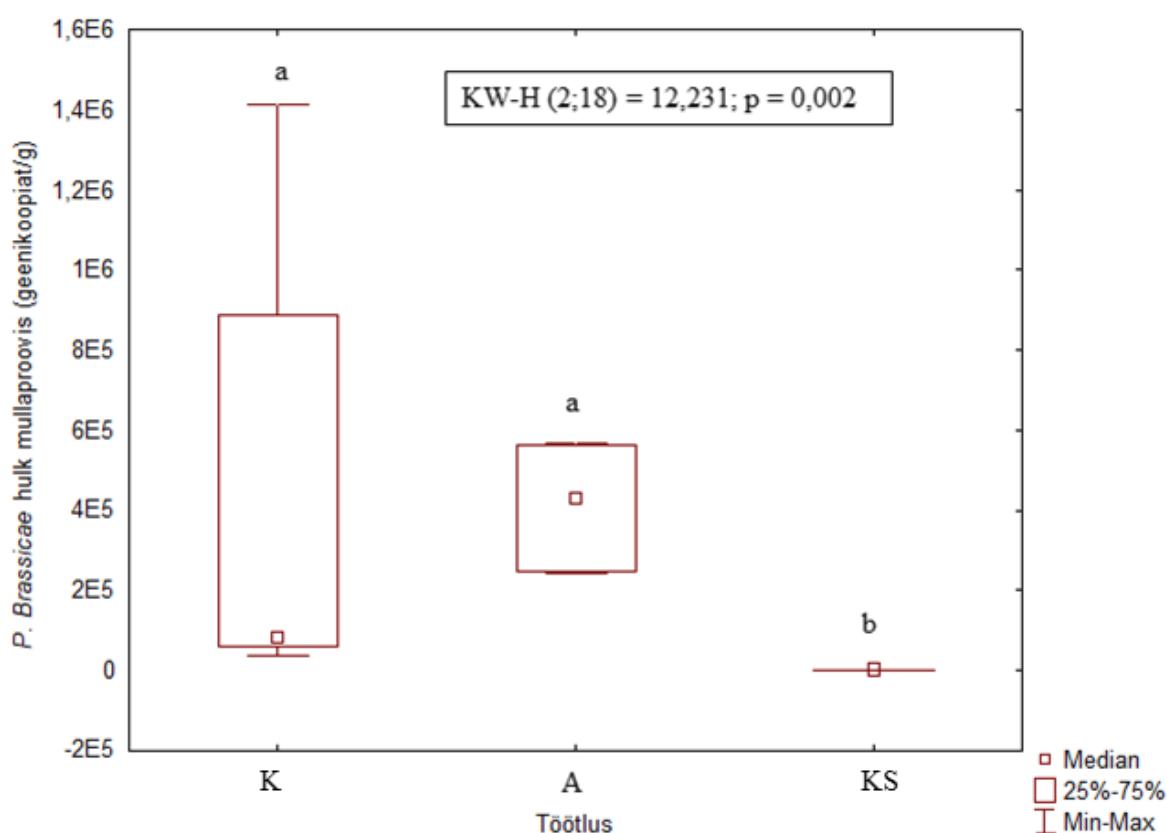
seisukorras. Kontrollvariandi (K) taimed olid väliselt kõige kehvemas olukorras, seevastu kontrollsteriilse (KS) variandi taimed kõige tervemad (joonis 5).



Joonis 5. Kontrollvariandis (K) ja kontrollsteriilses (KS) katsevariandis kasvanud paksoi taimed peale katse lõppu.

Statistiliselt oluline erinevus patogeeni hulga osas esines kontrollvariandi (K) ja kontrollsteriilse variandi (KS) vahel ning algse põllult kogutud mulla (A) ja kontrollsteriilse (KS) variandi vahel (joonis 6). Kontrollvariandi mullas (K) ja algse sügisel põllult kogutud mullas (A) *P. brassicae* hulga kvantifitseerimisel statistiliselt olulist erinevust ei leitud (joonis 6). Siiski tuli qPCR metoodikat kasutades ilmsiks kontrollmulla (K) erinevates proovides varieeruv patogeeni kontsentratsioon. Maksimaalne kontsentratsioon ulatub (K) mullaproovis suuremaks kui (A) mulla proovidel. Suur varieeruvus *P. brassicae* hulga määramisel esines ka katsevariandi P3 erinevates proovides.

Katsevariantides K, P1, P2, P3 ja P4 kasvanud taimedest tehtud fotodel omavahelisi väliseid erinevusi ei täheldatud ja nuutrinakkust esines kõikides katsevariantides võrdväärselt (LISA 2).



Joonis 6. *P. brassicae* hulk (geenikoopiat/g) põllult sügisel kogutud mullaproovis (A), kontrollvariandi (K) ja kontrollsteriilse (KS) variandi proovides. Erinevad tähed graafikul näitavad statistiliselt olulisi erinevusi katsevariantide vahel ($p < 0,05$).

5. ARUTELU JA JÄRELDUSED

Käesolevas töös katsetati turul oleva biopreparaadi Bactomix 5 efektiivsust ristõieliste nuutri tekitaja *P. brassicae* alla surumisel ja selgitati välja kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) meetodika sobivust mullapatogeeni puhkeoste määramiseks mullast. 2018. aastal Eesti Maaülikoolis läbi viidud uurimusest selgus, et mulla töötlemisel kasutatud biopreparaat Bactomix 5 mõju ristõieliste nuutrit põhjustava patogeeni *P. brassicae* alla surumisel ei ilmnunud ja patogeeni kogus mullas ei vähenenud.

Vaatamata piisavale töötluste arvule esines kontrollvariandis (K) ja variandis P3 *P. brassicae* hulga suur varieerumine erinevate pottide muldade seas, mis näitab meetodika täpsustamise vajadust proovide maksimaalse homogeniseerimise näol.

Katse P3 ja P4 variantides, kus mulda töödeldi kasvuajal kaks korda (vastavalt tootjapoolse soovitatud kogusega ja topeltkogusega), olid *P. brassicae* näitajad mõnevõrra suuremad. Väidet kinnitab Einhorn *et al.* 1991 uuring, millest saab järeldada, et tegemist võib olla hoopis preparaadis sisalduvate bakterite stimuleeriva toimega patogeeni puhkeoste idanemisele. Ometi on mitmetes uuringutes täheldatud vastupidist ning *Bacillus sp.* tüvede patogeeni pärssiv toime on leidnud kinnitust arvukates laborikatsetes (Gao, Xu 2014; Lahlali *et al.* 2013; Peng *et al.* 2014; He *et al.* 2018). Kuna tegemist oli erinevate liikide kombinatsiooniga, siis tulevad mängu ka nende liikide omavahelised antagonistlikud mõjud, mida on omakorda raske hinnata seesuguses katses.

Teatud juhtudel on bioloogilistes preparaatides nende efektiivsuse suurendamiseks kasutatud erinevate toimeainete segusid (Kim *et al.* 2008), ent välistatud ei ole ka toimeainete omavaheline antagonistlik toime (O'Brien 2017). Eelkõige sõltub biopreparaadi efektiivsus nii selle mikrobioloogilisest koostisest kui ka töödeldavast substraadist (Lengai, Muthomi 2018), mistõttu on vajalik erinevate potentsiaalsete toimeainete eelnev katsetamine ja selekteerimine *in vitro* tingimustes, et tagada toote patogeene pidurdav toime. Oluline on kindlaks teha ka optimaalsed toimeainete kontsentratsioonid preparaatides, mille kasutegur oleks maksimaalne.

Antud kirjandusele tuginedes tuleks *P. brassicae* vastu katsetada kontrollitud bioloogilise aktiivse toimeainega biofungitsiidide (nt. Serenade ja Prestop). Mitut erinevat bakteriliiki või -tüve sisaldavate preparaatide puhul ei pruugi olla tagatud vajalikke tingimusi nende biofungitsiidina käsitlemiseks. Garanteeritud. Lisaks on raske tagada mikroorganismide kompleksist koosneva preparaadi korrektne käitlemine, mistõttu võib aktiivse bioloogilise toimeaine püsivus ja elujõulisus olla langenud (Bashan 1998).

Biostimulaatorid ja taime kasvu soodustavad preparaadid võivad edendada taime tervist ja kasvu, soodustada toiteelemendite kättesaadavust ja suurendada taime vastupanuvõimet haigusetekiitajatele, ent otsene tõhusus mullapatogeenide allasurumisel olla ebapiisav või puudulik, sarnaselt antud töös katsetatud Bactomix 5-ga. Risosfäär koos selles elutsevate mikroobide kooslustega on kompleksne keskkond (Handelsmann, Stabb 1996), mistõttu on bioloogiliste toodete mõju nii taimedele kui ka teistele mikroorganismidele raske ennustada. Bioloogiliste preparaatide toimeainete mõju hindamiseks on oluline läbi viia uuringuid kindlate kultuuride piires ja erinevates viljelussüsteemides, mis ei piirdu ainult laborikatsetega. Arvesse tuleb võtta kasvukoha kliimatilisi tingimusi (O'Brien, 2017), mullatüüpi ja muid tegureid.

Teisalt osutus patogeeni kvantitatiivne määramise meetod ehk qPCR piisavalt tundlikuks ja spetsiifiliseks *P. brassicae* puhkeoste määramiseks mullast, olles seejuures ka kiire ja usaldusväärne. Kvantitatiivse DNA määramise põhiselt on võimalik taimekasvatajatele ja põllumeestele töötada välja spetsiifilised suunised külvikorra ja viljavahelduse planeerimiseks, tagamaks ristõielistele taimedele soodsad kasvutingimused ja vähendada ristõieliste nutri levimise riski.

Rootsis on välja töötatud esimene selletaoline metoodika (Wallenhammar *et al.* 2012) *P. brassicae* nakkuse riskianalüüsiks, mis võimaldab määrata patogeeni DNA koguse nakatunud põldudelt, määrates seda erinevatest põllupunktidest. Antud tehnika on rakendatav laboratooriumites jooksvate analüüside läbi viimiseks, kuna DNA eraldamine ja qPCR analüüs võtab aega vähem kui üks tööpäev. Protokoll on Rootsi turul kättesaadav ja suunisena rakendatav enne ristõieliste kultuuride kasvatama asumist. See on ka oluline resistentsete ristõieliste sortide kasvatamisel, mille eelduseks on nutrinakkuse ulatuse hindamine mullas. Vältimaks suuri saagikadusid, on antud protokollis resistentsete sortide kasvatamiseks soovitatav nakkuse piirmäär 3×10^3 *P. brassicae* puhkeost 1 g mullas. Üldtunnustatud nakkuse

piirmäär sümptomite moodustamiseks on 1000 puhkeest 1 g kuiva mulla kohta, ent põldudel võivad laved varieeruda mullatüübist või keskkonnatingimustest sõltuvalt. (Wallenhammar *et al.* 2012) Nakkuse lubatud piirmäära järgi on taimekasvatajatel võimalik hinnata põldude sobivust või mitesobivust ristõieliste kasvatamiseks. Sarnased katsed, mis võimaldaks selgitada välja nakkuse piirmäära Eesti põldudel ja mille põhjal töötada välja otsesed juhtnöörid ristõieliste viljelemiseks Eesti oludes praegusel hetkel puuduvad.

Rootsi allikate andmetel on nuutritekitaja märkimisväärseks paljunemiseks vajalik püsieoste kontsentratsiooni tase mullas suurem kui 750 000 eost ühe grammi kohta, kusjuures vahemikus 3000 – 750 000 eost grammi kohta on resistentsete sortide kasvatamine näidustatud (Wallenhammar *et al.* 2016). Saagikaod ei olene ainult patogeeni DNA kontsentratsioonist mullas, vaid ka nakatumise ajast ehk teisisõnu nakatumisele järgneva kasvuhooaja tingimustest (*Ibid.*). Käesoleva uurimustööst selgus, et Rõhu Katsejaama Õssu põllulappidelt kogutud mulla algne püsieoste kontsentratsioon oli keskmiselt 412 000 geenikoopiat 1 g mulla kohta, millest võib järeldada, et antud kasvukohal on nakkuse tase kõrge.

KOKKUVÕTE

Ristõieliste nuuter on ristõieliste kultuuride seas leviv raske mullahaigus, mida põhjustab protistide hõimkonda kuuluv obligatoorne patogeen *P. brassicae*. Patogeeni püsieosed võivad mullas elujõulisena püsida ligikaudu 20 aastat. Keemiline tõrje on nuutri nakkuse puhul ebapraktiline ja kulukas. Tervisele ning keskkonnale taimekaitsevahendite kasutamisest tuleneva ohu ja mõju vähendamiseks on hakatud uurima looduslikke mikroorganismidel põhinevaid bioloogilisi preparaate.

Käesoleva bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks oli välja selgitada bakterpreparaadi Bactomix 5 mõju ristõieliste nuutritekitaja *P. brassicae* nakkuse allasurumisel ja hinnata kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) meetodika sobivust patogeeni tuvastamiseks mullaproovidest.

Töö teoreetilises osas on kirjeldatud biopreparaatide olemust ja rakendamist põllumajanduses, sh biopreparaadi Bactomix 5 mõju taimede kasvule tootjapoolse informatsiooni põhjal. Laiemalt on käsitletud ristõieliste nuutri olemust, ohtlikkust taimekasvatuses, samuti võimalikke tõrjemeetmeid.

2017. aasta novembris rajatud katse kestus oli 10 nädalat. Mullaproove töödeldi erinevate Bactomix 5 doosidega ja intervallidega. Katsevariantide seas olid ka autoklaavitud muld ja kontrollmuld, mida preparaadiga ei töödeldud. Katse lõpus eraldati mullaproovidest *P. brassicae* DNA ja määrati reaajas qPCR meetodikaga patogeeni DNA kontsentratsioon igas mullaproovis.

Analüüside käigus ei kinnitatud hüpoteesi Bactomix 5 võimaliku mõju kohta patogeeni allasurumisel, kuna tulemused omavahel statistiliselt ei erinenud. Küll aga osutus qPCR meetodika patogeeni kvantitatiivsel tuvastamisel efektiivseks. Kuna *P. brassicae* on mullas hästi säiliv patogeen, on qPCR meetodiga nakkuse ulatuse hindamine määrava tähtsusega ristõieliste taimede kultiveerimisel ja tõrjemeetmete välja töötamisel.

Täpsemate järelduste tegemiseks on soovitatav läbi viia rohkem katseid kontrollitud toimeainet sisaldavate bioloogiliste preparaatidega ristõieliste kultuuride piires.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abou-Aly, Hamed & Na, Neweigy & Zaghloul, Rashed & Sa, El-Sayed & Am, Bahloul.** (2015). Evaluation of Some Biocontrol Agents against Soil Pathogenic Fungi. – *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. Vol 6.
- Alamri, S., Hashem, M., Mostafa Y.S.** (2012). In vitro and In vivo Biocontrol of Soil-Borne Phytopathogenic Fungi by Certain Bioagents and Their Possible Mode of Action. – *Biocontrol Science*, Vol. 17, Issue 4, pp. 155-167.
- Almquist C.** 2016. Monitoring Important Soil-Borne Plant Pathogens in Swedish Crop Production Using Real-Time PCR. Doktoritöö. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. 78 lk.
- Anders, J., Katarzyna, MS., Gunnar, B. Wallenhammar, A.C.** (2016) Quantitative PCR shows propagation of *Plasmodiophora brassicae* in Swedish long term field trials. – *European Journal Of Plant Pathogens*, Vol. 145, Issue 3, pp 573–581.
- Araújo, K.M., Lima, A., Silva, J.N., Rodrigues, L.L., Amorim, A.G.N., Quelemes, P.V., Santos, R.C., Rocha, J.C., Andrades, E.O., Leite, J.R.S.A., Mancini-Filho, J. and Trindade, R.A.** (2014). Identification of Phenolic Compounds and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Euphorbia tirucalli* L. – *Antioxidants*, Vol. 3, pp. 159-175.
- Ayers G.W.** (1944): Studies on the life history of the club root organism, *Plasmodiophora brassicae*. – **Canadian Journal of Research**, Vol. 23, pp. 143–149.
- Bar, T., Ståhlberg, A., Muszta, A., Kubista, M.** (2003). Kinetic Outlier Detection (KOD) in real-time PCR. – *Nucleic Acids Research*, Vol. 31 pp. e105.
- Bashan Y, de-Bashan L.E.** (2010). Chapter two — How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. – *Advances in Agronomy*, Vol. 108, pp. 77–136.
- Bashan, Yoav.** (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. – *Biotechnology Advances*, Vol. 16, pp. 729-770.
- Beric, T., Koji, M., Stankovi, S., Topisirovi, L., Degrassi, G., Myers, M., Venturi, V. and Fira, D.** (2012). Antimicrobial Activity of *Bacillus* sp. Natural Isolates and their Potential use in the Biocontrol of Phytopathogenic Bacteria. – *Food Technology and Biotechnology*, 1, pp. 25-31.

- Bharathi, S.** (2004). Development of botanical formulations for the management of major fungal diseases of tomato and onion. PhD thesis. Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India, 152 lk.
- Bhattacharyya, Pranab., Jha, Dhruva.** (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. – *World journal of microbiology & biotechnology*. Vol. 28. 1327-50.
- Donald C., Porter, I.** (2009) Integrated control of clubroot. – *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 28, No. 3, pp. 289–303.
- CABI.** <https://www.cabi.org/isc/datasheet/41865> (28.03.2019)
- Cao, T., Rennie, D. C., Manolii, V. P., Hwang, S. F., Falak, I. and Strelkov, S. E.** (2014). Quantifying resistance to *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica* hosts. – *Plant Pathology*, Vol. 63, pp. 715–726.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Cle'ment C, E.A. Barka.** (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. – *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, pp. 4951–4959.
- Cook R.J.** (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. – *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 31, pp. 53–80.
- Fravel D.R.** (2005). Commercialization and implementation of bio-control. – *Annual Review of Phytopathology*, 43, pp. 337–359.
- Damalas, C.A.; Koutroubas, S.D.** Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. – *Agriculture*, Vol. 8, 13.
- Deora A., Gossen B.D., McDonald M.R.** (2013). Cytology of infection, development and expression of resistance to *Plasmodiophora brassicae* in canola. – *Annals of Applied Biology*, Vol. 163, pp. 56–71.
- Dixon G R.** (2006). The biology of *Plasmodiophora brassicae* Wor. – A review of recent advances. – *Acta Horticulturae*. Vol. 706, pp. 271-282.
- Dixon G.R.** (2009b). *Plasmodiophora brassicae* in its environment. – *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 28, pp. 212–228.
- Dixon, G.R.** (2009) The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. – *Journal of Plant Growth Regulation*. Vol. 28, pp. 194–202.
- Dubois, C., Arsenault-Labrecque, G., Pickford, J.** (2017). Evaluation of a new biopesticide against angular leaf spot in a commercial operation system. – *Acta Horticulturae*. Vol. 1156, pp. 757–764.
- Einhorn, G., Bochow, H., Huber, J., Krebs, B.** (1991). Methodological studies on the detection of antagonists of the clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae* Wor. – *Archive für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, Vol. 27, pp. 205-208.

- Friberg, H.** (2005). Persistence of *Plasmodiophora brassicae* - Influence of Non-Host Plants, Soil Fauna and Organic Material. Doktoritöö. Swedish University of Agricultural Sciences, 26 lk.
- Gao, Y., Xu, G.** Development of an Effective Nonchemical Method against *Plasmodiophora brassicae* on Chinese Cabbage. – *International Journal of Agronomy*, Vol. 2014, pp. 1-5.
- Ganeshan, G., Kumar, A.M.** (2005). *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. – *Journal of Plant Interactions*, Vol.1:3, pp. 123-134.
- Gómez Expósito R., de Bruijn I., Postma J., Raaijmakers J.M.** (2017). Current Insights into the Role of Rhizosphere Bacteria in Disease Suppressive Soils. – *Frontiers in Microbiology*, 8:2529.
- Gossen B.D., Adhikari K.K.C., McDonald M.R.** (2012). Effects of temperature on infection and subsequent development of clubroot under controlled conditions. – *Plant Pathology*, Vol. 61, 593–599.
- Handelsman, J., Stabb, E. V.** (1996). Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. – *The Plant Cell*, Vol. 8(10), pp. 1855–1869.
- He, P., Cui, W., Munir, S., He, P., Li, X., Wu, Y., Yang, X., Tang, P. He, Y.** (2019). *Plasmodiophora brassicae* root hair interaction and control by *Bacillus subtilis* XF-1 in Chinese cabbage. – *Biological control*, Vol 28, pp. 56-63.
- Horst, R. Kenneth.** (2012) Westcott's Plant Disease Handbook Eight Edition. Netherlands: Springer, 826 lk.
- Hossain, M. A., Alsabari, K. M., Weli, A.M., Al-Riyami, Q.** (2013) Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis and Total Phenolic Contents of Various Crude Extracts from the Fruits of *Datura metel* L. – *Journal of Taibah University for Science*, Vol. 7, pp. 209-215.
- Hwang S.F., Ahmed H.U., Zhou Q., Strelkov S.E., Gossen B.D., Peng G., Turnbull G.D.** (2011b): Influence of cultivar resistance and inoculum concentration on root hair infection of canola (*Brassica napus*) by *Plasmodiophora brassicae*. – *Plant Pathology*, Vol. 60, pp. 820–829.
- Hwang S.F, Ahmed H.U, Strelkov S.E et al.** (2011). Seedling age and inoculum density affect clubroot severity and seed yield in canola. – *Canadian Journal of Plant Science*, Vol. 91, pp. 183–90.
- Hwang, S., Strelkov, S. E., Feng, J. , Gossen, B. D. And Howard, R. J.** (2012), *Plasmodiophora Brassicae*: A Review Of An Emerging Pathogen Of The Canadian Canola (*Brassica Napus*) Crop. – *Molecular Plant Pathology*, Vol. 13, pp. 105-113.
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux J-P.** (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. – *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Vol.16, No. 10, pp. 51–58.
- Ingram D.S., Tommerup I.C.** (1972): The life history of *Plasmodiophora brassicae* Woron. – *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, Vol. 180, pp. 103–112.

- Ishikawa, S.** (2013). Integrated disease management of strawberry anthracnose and development of a new biopesticide. – *Journal of General Plant Pathology*, Vol. 79, pp. 441–443.
- Islam, M. R., Jeong, Y. T., Lee, Y. S., & Song, C. H.** (2012). Isolation and Identification of Antifungal Compounds from *Bacillus subtilis* C9 Inhibiting the Growth of Plant Pathogenic Fungi. – *Mycobiology*, Vol. 40(1), pp. 59–66.
- Javaid, M.K., Ashiq, M. and Tahir, M.** (2016). Potential of Biological Agents in Decontamination of Agricultural Soil. – *Scientifica*, Vol. 2016, pp. 9.
- Junaid, J.M., Dar, N.A., Bhat, T.A., Bhat, A., Bhat, A.** (2013). Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. – *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, Vol.1. pp. 39-57.
- Kim Y.C, Jung. H, Kim K.Y, Park S.K.** (2008) An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. – *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 120, pp. 373–382.
- Kirk, W.W., Schafer, R.S.** (2015) Efficacy of new active ingredient formulations and new biopesticides for managing *Fusarium* root rot disease of gladiolus hybrids. – *Acta Horticulturae*, Vol. 1105, pp. 55–60.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N.** (1980). *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease suppression in soils. – *Current Microbiology*, Vol. 4, pp. 317-320.
- Kumar, S.** (2012) Biopesticides: A Need for Food and Environmental Safety. – *Journal of Biofertilizers and Biopesticides* 3:e107
- Kumar, S.; Singh, A.** (2015) Biopesticides: Present status and the future prospects. – *Journal of Fertilizers and Pesticides*, Vol. 6, Issue 2, e129.
- Kurowski, T. P., Majchrzak, B., and Kowalska, E.** (2009). The effectiveness of the biological control of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassicaceae* plants. – *Phytopathologia*, Vol. 52, pp. 5–12.
- Lahlali R., Peng G., Gossen B.D., McGregor L., Yu F.Q., Hynes R.K., Hwang S.F., McDonald M.R., Boyetchko S.M.** (2013). Evidence that the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host resistance. – *Phytopathology*, Vol. 103, pp. 245–254.
- Lengai, G., Muthomi, J.** (2018) Biopesticides and Their Role in Sustainable Agricultural Production. – *Journal of Biosciences and Medicines*, Vol. 6, pp. 7-41.
- Lübeck, M.** (2004) Molecular Characterization of *Rhizoctonia solani*, Editor(s): Dilip K. Arora, George G. Khachatourians. – *Applied Mycology and Biotechnology, Elsevier*, Vol. 4, pp. 205-224.

- Martinez-Viveros O., Jorquera M.A., Crowley D.E., Gajardo G., Mora M.L.** (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. – *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, Vol. 10, pp. 293–319.
- Mazzola, M., Freilich, S.** (2017) Prospects for Biological Soilborne Disease Control: Application of Indigenous Versus Synthetic Microbiomes. – *Phytopathology*, Vol. 107, No. 3, pp. 256-263.
- Mumford R.A., Walsh K., Barker I., Boonham N.** (2000). Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus Using a Multiplex Real-Time Fluorescent Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assay. – *Phytopathology*. Vol. 90, pp. 448–453.
- Nakayama T, Sayama M.** (2013) Suppression of potato powdery scab caused by *Spongospora subterranea* using an antagonistic fungus *Aspergillus versicolor* isolated from potato roots Conference poster. – *Proceedings of the Ninth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Obihiro, Hokkaido, Japan*, 19–22 August, pp. 53–54.
- O'Brien, P.** (2017). Biological control of plant diseases. – *Australasian Plant Pathology*. Volume 46, Issue 4, pp. 293–304.
- Pal, K.K., McSpadden Gardener, B.** (2006). Biological Control of Plant Pathogens. – *The Plant Health Instructor*. Vol. 2.
- Peng G., Lahlali R., Hwang S.F., Pageau D., Hynes R.K., Mc-Donald M.R., Gossen B.D., Strelkov S.E.** (2014): Crop rotation, cultivar resistance, and fungicides/biofungicides for managing clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola. – *Canadian Journal of Plant Pathology*, Vol. 36, pp. 99–112.
- Peng G., L. McGregor, R. Lahlali et al.** (2011). Potential biological control of clubroot on canola and crucifer vegetable crops. – *Plant Pathology*, Vol. 60, No. 3, pp. 566–574.
- Plant Parasites of Europe.** *Plasmodiophora brassicae*.
<https://bladminerders.nl/parasites/animalia/cercozoa/phytomyxea/plasmodiophoraceae/plasmodiophora/plasmodiophora-brassicae/> (02.03.2019)
- PMA** **Taimekaitse** **vahendite** **register.**
<https://portaal.agri.ee/avalik/#/taimekaitse/taimekaitsevahendid-otsing/et> (27.04.2019)
- Rennie D.C, Manolii V.P., Cao T., Hwang S.F., Howard R.J., Strelkov S.E.** (2011): Direct evidence of surface infestation of seeds and tubers by *Plasmodiophora brassicae* and quantification of spore load. *Plant Pathology*, Vol. 60, pp. 811-819.
- Řičařová V., Kazda J., Singh K., Ryšánek P.** (2016): Clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae* Wor.: a review of emerging serious disease of oilseed rape in the Czech Republic. – *Plant Protection Science*, Vol.52, pp. 71–86.

- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., Moorman, A. F. M.** (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. – *Nucleic Acids Research*, Vol. 37 pp. e45.
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Kloepper J.W et al.** (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. – *Plant Physiology*, Vol. 134, pp. 1017–1026.
- Sahu, D.K., Khare, C.P. and Patel, R.** (2014) Eco-Friendly Management of Early Blight of Tomato Using Botanical Plant Extracts. – *Journal of Industrial Pollution Control*, Vol. 2, pp. 215-218.
- Scandagra.** Mahetooted, Bactomix 5. <https://scandagra.ee/tooted/bactomix-5/> (05.04.2019)
- Schena L, Nigro F, Ippolito A, Gallitelli D.** (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. – *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 110, pp. 893–908.
- Singh, H.B.** (2014) Management of Plant Pathogens with Microorganisms. – *Proceedings of the Indian National Science Academy*, Vol. 2, pp. 443-454.
- Suprpta, D.N.** (2012) Potential of Microbial Antagonists as Biocontrol Agents against Plant Fungal Pathogens. – *International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences Journal*, Vol. 2, pp. 1-8.
- Tan, T., Zhu, J., Shen, A. et al.** (2019) Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* HZ-72 exhibiting biocontrol activity against flax seedling blight. – *European Journal of Plant Pathology*, Vol.153, pp. 825-836.
- Vannacci, G., Gullino, M.** (2000). Use of biocontrol agents against soil-borne pathogens: Results and limitations. – *Acta horticulturae*. Vol. 532. pp. 79-87.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S., Lorito, M.** (2008). A novel role for The *Trichoderma*–plant interaction *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. – *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol. 72, pp. 80-86.
- Volker, H. P.** (2013). Raps: Krankheiten, Schädlinge, Unkräuter. Agroconcept. 208 lk.
- Wallenhammar A C.** (1996). Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. – *Plant Pathology*. Vol. 45, pp. 710-719.
- Wallenhammar, A., Almquist, C., Söderström, M., Jonsson, A.** (2012), In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. – *Plant Pathology*, Vol. 61, pp. 16-28.
- Wallenhammar, A. C., Gunnarson, A., Hansson, F., Jonsson, A.** (2016). Quantification of *Plasmodiophora brassicae* Using a DNA-Based Soil Test Facilitates Sustainable Oilseed Rape Production. – *Plants (Basel, Switzerland)*, Vol. 5, 21

- Wallenhammar, A. C.** (1996). Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. – *Plant Pathology*, Vol. 45, pp. 710–719.
- Wallenhammar, A. C.** (1999). Monitoring and control of *Plasmodiophora brassicae* in spring oilseed *Brassica* crops. – *Acta Horticulturae*, Vol. 867, pp. 181-190
- Wang E.T, Martinez-Romero E** (2000) *Sesbania herbacea*-Rhizobium huautlense nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S.herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. – *Microbial Ecology*, Vol. 40, pp.25–32.
- Webster, M. A.** (1986). pH and nutritional effects on infection by *Plasmodiophora brassicae* Wor. and on clubroot symptoms. PhD thesis. University of Aberdeen, 273 lk.
- Weller, D. M.** (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. – *Phytopathology*, Vol. 97, pp. 250-256.
- Whipps, J.M.** (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. – *Journal of Experimental Botany*, Vol. 52, pp.487-511.
- Zamani-Noor, N., Rodemann, B.** (2018). Reducing the build-up of *Plasmodiophora brassicae* inoculum by early management of oilseed rape volunteers. – *Plant Pathology*, Vol. 67, pp. 426-432.

THE EFFECT OF THE BIOLOGICAL PRODUCT BACTOMIX 5 ON THE DEVELOPMENT OF CLUBROOT CAUSED BY PLASMODIOPHORA BRASSICAE

SUMMARY

Plasmodiophora brassicae is an economically significant soil borne pathogen causing club root disease in Brassica species resulting in considerable yield losses among crucifer crops. Clubroot is particularly hard to manage since it's resting spores are viable in soil for many years and the cultural practices of the disease are limited. Crop rotation and resistant cultivars are currently advocated as a long term disease management technique. Chemical inputs generally prove to be environmentally destructive and are technically and economically challenging. Therefore, different approaches are required to control the disease and reduce the use of chemical compounds in agriculture. Biological control is an appropriate alternative in fighting plant pathogens. Some species of bacteria have the ability to suppress diseases, exhibiting activities against plant pathogens via various mechanisms such as competition, antibiosis, predation, and parasitism.

The aim of this study was to analyse the effect of a certain bacterial product Bactomix 5 on the development of clubroot and it's potential pathogen suppressive activity. Additionally, this thesis focuses on the assessment and validation of real-time PCR method for detection and quantification of *P. brassicae*. The initial hypothesis was that Bactomix 5 is effective at controlling *P. brassicae* infection.

In the fall of 2017 soil samples already infected with *P. brassicae* were collected from Rõhu Experimental station in Tartumaa. A pot experiment with five different treatment variants with six replicates at each were established. Pak choi was used as a host plant during the 10 week long trial.

The data collected did not support the original hypothesis as the results were not statistically significant. Although, qPCR proved to be a rapid and reliable method for DNA quantification and may be used to monitor plant pathogens such as *P. brassicae*.

For more detailed conclusions, further research based on testing different controlled bacterial products on *P. brassicae* is needed. Products containing only one active agent rather than a mixture of multiple substances is advised.

LISAD



BactoMix 5

Mikroorganismide kogum mulla bioloogilise aktiivsuse taastamiseks, taimejäänuste lagunemist soodustav preparaat ning seemnete puhumiseks.

Mikroorganismide kogum mulla bioloogilise aktiivsuse taastamiseks, taimejäänuste lagunemist soodustav preparaat ning seemnete puhumiseks. Biopreparaadis olev mikroorganismide kompleks lagundab aktiivselt taimede jäänuseid ning samal ajal pidurdavad bakterite elutegevuse käigus tekkivad antibiootilised ained taimchaigusi põhjustavate mikroorganismide arenemist. Biopreparaadis olevate mikroorganismide kompleks vabastab mullast taimede toitumiseks vajalikke aineid, kiirendab seemnete idanemist, taimede kasvu ning suurendab nende saagikust. Lisaks soodustavad bakterid taimede arenemist, kuna aitavad fikseerida bioloogilist lämmastiku ja suurendada taimedele omastatava fosfori kogust mullast.

Preparaadi koostis ja toime:

- *Bacillus subtilis* V-845 D ja V-843 D – soodustavad taimede kasvu, pidurdavad patogeensete mikroorganismide arenemist ja lagundavad aktiivselt taimede jäänuseid.
- *Pseudomonas aurantiaca* – pidurdab patogeensete mikroorganismide arenemist, lagundab aktiivselt taimede jäänuseid.
- *Brevibacillus* sp. – soodustab taimede arenemist, fikseerib bioloogilise lämmastiku.
- *Bacillus megaterium* – suurendab taimede poolt omastatava fosfori kogust mullas, soodustab mulla puhastumist toksilistest ainetest (pestitsiidid jms. ained).

Bakterite kontsentratsioon on vähemalt 6×10^9 kolooniat moodustavat tükut milliliitri kohta.

Kasutamine ja kulunorm:

Bactomix-5 soovitame pihutada kasvavatele taimedele, tulemuseks on kõrgem ja kvaliteetsem saak. Katsetulemused on näidanud, et Bactomix-5 kasutamisel suureneb 15-20% mineraalse lämmastiku ja fosfori omastamine.



Parandab taimede toitumist, soodustab narmasjuurte teket



Elujõus muld- Bactomix-5



Taimejäänuste lagundamiseks pritsida 1 ha-le 0,5 -0,7 l biopreparaati (sõltuval mulla viljakusest), lahustades 200 l vees. Valmis pritsimislahust tuleb kaitsta otsese päikesekiirguse eest ja ära kasutada samal päeval. Võib kasutada koos lägalaotusega. Preparaadi kasutamise ajal peab mullas olema 10-12 cm sügavusel +5 °C temperatuuri juures vähemalt 60% niiskust. Mitte kasutada koos taimekaitsevahenditega.



Töötlemata põhk



2. nädala pärast



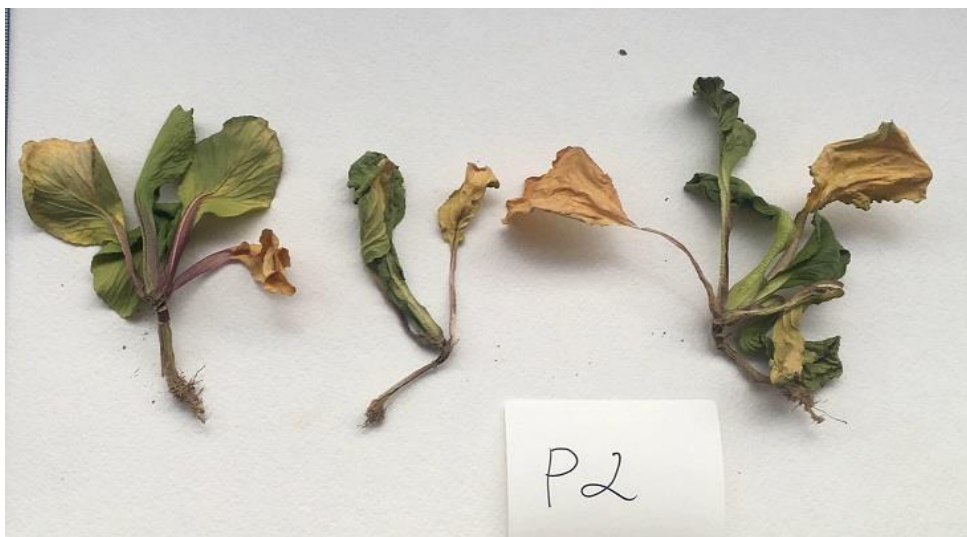
2 kuud pärast töötlust

Puhtimisel tuleb vältida otsest päikest ning seemned külvata võimalikult kohe. Ühele hektarile külvatavad seemned soovitatakse puhtida 0,5 l biopreparaadiga, lahustatuna 1-5 l vees.

Säilitamine.

Soovitav säilitusaeg on 3 kuud peale valmistamise kuupäeva, temperatuuril + 5 kuni + 10 °C, tihedalt suletud pakendis kuivas kohas. Pikema säilitusaja jooksul bakterite toime efektiivsus võib väheneda.

Lisa 2. Pildid katsevariantide P1, P2, P3, P4 taimedest katse lõpus



Lisa 2 järg



Lisa 3. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Marian Põldmets
(*autori nimi*)
sünniaeg 22.05.1990

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud lõputöö Biopreparaadi Bactomix 5 toime ristõieliste nuutritekitaja (*Plasmodiophora brassicae*) arengu takistamisel (*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja(d) on Riinu Kiiker, Kaire Loit, Angela Ploomi,
(*juhendaja(te) nimi*)

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____
(*allkiri*)

Tartu, _____
(*kuupäev*)

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

(*juhendaja nimi ja allkiri*)

(*kuupäev*)

(*juhendaja nimi ja allkiri*)

(*kuupäev*)

(*juhendaja nimi ja allkiri*)

(*kuupäev*)